

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einführende Bemerkungen

Die im Folgenden geschilderten Ergebnisse beantworten nach einer Darstellung des PC-Verlustes und der subsequenten Denervation der DCN anhand von Calb-Immuncytochemie die Frage nach dem Auftreten Parv-positiver Neurone in den DCN der Mutanten *sg*, *nr* und *Lc*. Zum Vergleich mit der Situation im Normaltier werden die Verhältnisse im Wildtypen jeweils zusammenfassend vorangestellt. Die Ergebnisse sind in erster Linie nach Art der verwendeten Antikörper gegliedert.

Beim Vergleich der einzelnen Mutanten fiel auf, dass bei *Lc* konstant eine diffuse Calb-Färbung nachweisbar war, wenngleich die Experimente an allen Mutanten unter absolut identischen Bedingungen durchgeführt wurden. Ob es sich dabei um eine unspezifische Hintergrundfärbung, oder nicht doch eher um Vorhandensein von Antigen handelt ist nicht sicher zu beurteilen.

#### 3.2 Bestimmung des PC-Verlustes und der Denervation der DCN anhand von Calbindin D-28k Immuncytochemie

##### 3.2.1 Wildtypen

PC-Verlust und Denervation der DCN werden anhand von Calb-Immuncytochemie demonstriert. Die Ergebnisse stimmen mit vorangehenden Studien (Legrand, 1983; Batini, 1990; Celio, 1990) überein und sollen nur kurz zusammengefaßt werden, um den direkten Vergleich mit Veränderungen in der PC-Population von mutanten Mäusen zu erleichtern: Das gesamte Cytoplasma der PC sowie ihre Dendriten, Axone und Terminalien in den DCN werden sehr deutlich dargestellt und damit fungiert Calb als Marker für die Größe der PC-Population. Im cerebellären Cortex zeigt sich eine kontinuierliche, lückenlose Immunreaktivität aller in der koronaren Ebene geschnittenen PC. Über alle DCN gleichmäßig verteilt finden sich stark immunpositive Fasern und Terminalien in hoher Dichte. Calb-positive Zellen werden

nicht sichtbar. (Abb. 3.1 A und 3.2 A).

### 3.2.2 Staggerer

Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der PC-Population, wobei die PC zudem kleiner als im Normaltier erscheinen. Die Zellen sind nicht wie bei Wildtypen in einer einlagigen Schicht angeordnet, sondern homogen über den Cortex verteilt. Isolierte PC-freie Cortexareale oder Areale fehlender Immunreaktivität in den DCN sind dabei nicht existent, es sei denn an Stellen, an denen Fasertrakte das Gewebe durchziehen. Darüberhinaus sind am äußeren Rand der DCN mit dorsolateraler Präferenz Zellen zu beobachten, die in Größe und Form PC ähneln und mit den PC des Cortex über einen Strang immunpositiver Zellen und Fasern verbunden sind. Diese großen Zellen waren in mehreren aufeinanderfolgenden Schnitten nachweisbar. (Abb. 3.1 B, 3.3 A und 3.3 C).

### 3.2.3 Nervous

Im Vergleich zu vorgenannter Mutante ist die PC-Population in *nr* stärker reduziert. Dies kommt auch in der Innervationsdichte der DCN zum Ausdruck. Im MCN finden sich noch relativ viele Calb-positive Fasern und Terminalien in den anterioren und lateralen Abschnitten des posterioren MCN, wohingegen im medialen Abschnitt des posterioren MCN nur ein Residuum an PC-Input nachweisbar ist. Eine genauere Betrachtung dieses Areals zeigt jedoch, dass sich an dieser Stelle eine größere Anzahl hypertrophierte PC Terminalien und Fasern finden (Abb. 3.5 A und B). Der ICN und LCN entbehren fast jeglicher Calb-positiver Strukturen, abgesehen von einem Cluster von immunreaktiven Fasern und Terminalien an ihren äußersten dorsalen Grenzen. (Abb. 3.1 C, 3.4 A, C und E).

### 3.2.4 Lurcher

Im cerebellären Cortex der ausgewachsenen *Lc*-Mutanten läßt sich im Vergleich zu den bisher erwähnten Mutanten ein noch stärker ausgeprägter PC-Verlust nachweisen. Hier fehlen die PC praktisch komplett, was ebenfalls mit Untersuchungen anderer Autoren übereinstimmt (Caddy & Biscoe, 1976). In den

DCN finden sich vereinzelt Calb-positive Fasern und Terminalien. (Abb. 3.1 D, 3.6 A und 3.6 C).

### **3.3 Parvalbumin in Neuronen der DCN**

#### 3.3.1 Wildtypen

Im MCN, ICN und LCN sind ohne Blockade des axonalen Transportes durch Colchizin (Celio, 1990) keine Parv-positiven Neurone nachweisbar. Ein an manchen Stellen recht intensives Färbeverhalten von Strukturen innerhalb der DCN legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Parv-positive Neurone handelt. Bei höherer Vergrößerung zeigt sich jedoch, dass die intensive Färbung durch Fasern und vor allem durch zahlreiche Terminalien, die um immunnegative Neurone gruppiert sind, zustande kommt. Parv-positive Somata sind an keiner Stelle zu sehen (Abb. 3.2 B).

#### 3.3.2 Staggerer

In den DCN von *sg* finden sich Parv-positive Neurone an deren äußeren dorsalen Grenzen, insbesondere im ICN und LCN. Diese ähneln in Größe und Form PC und sind in Gruppen angeordnet. Sie weisen über einen Strang immunpositiver Zellen eine Verbindung mit dem cerebellären Cortex auf. Im Vergleich mit alternierenden Calb-Schnitten gewinnt man den Eindruck, dass diese Zellen mit den dort beschriebenen Calb-positiven Zellen identisch sind (Abb. 3.3 B und 3.3 D).

#### 3.3.3 Nervous

Parv-positive Neurone sind in allen drei DCN nachweisbar. Im LCN und ICN zeigen sie eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Kerngebiet. Im MCN lassen sich Unterschiede hinsichtlich des Verteilungsmusters feststellen. Im dorsalen Kernanteil erscheint die Dichte Parv-positiver Neurone etwas geringer als in den anderen beiden Kernen, im anterioren Abschnitt fehlen Parv-positive Neurone ganz. Hier kommt die Färbung durch Terminalien und Fasern zustande, was auch bei geringer Vergrößerung gut zu erkennen ist (Abb. 3.4 B, D und F).

### 3.3.4 Lurcher

Auch in *Lc* sind in allen drei DCN Parv-positive Neurone zu sehen. Sie sind homogen im LCN, ICN und MCN vorhanden und lassen keine Unterschiede bezüglich Verteilungsmuster und -dichte erkennen.

**Abbildung 3.1 A-D:** Übersichtsaufnahmen Wildtyp und Mutanten



Fortsetzung auf Seite 46

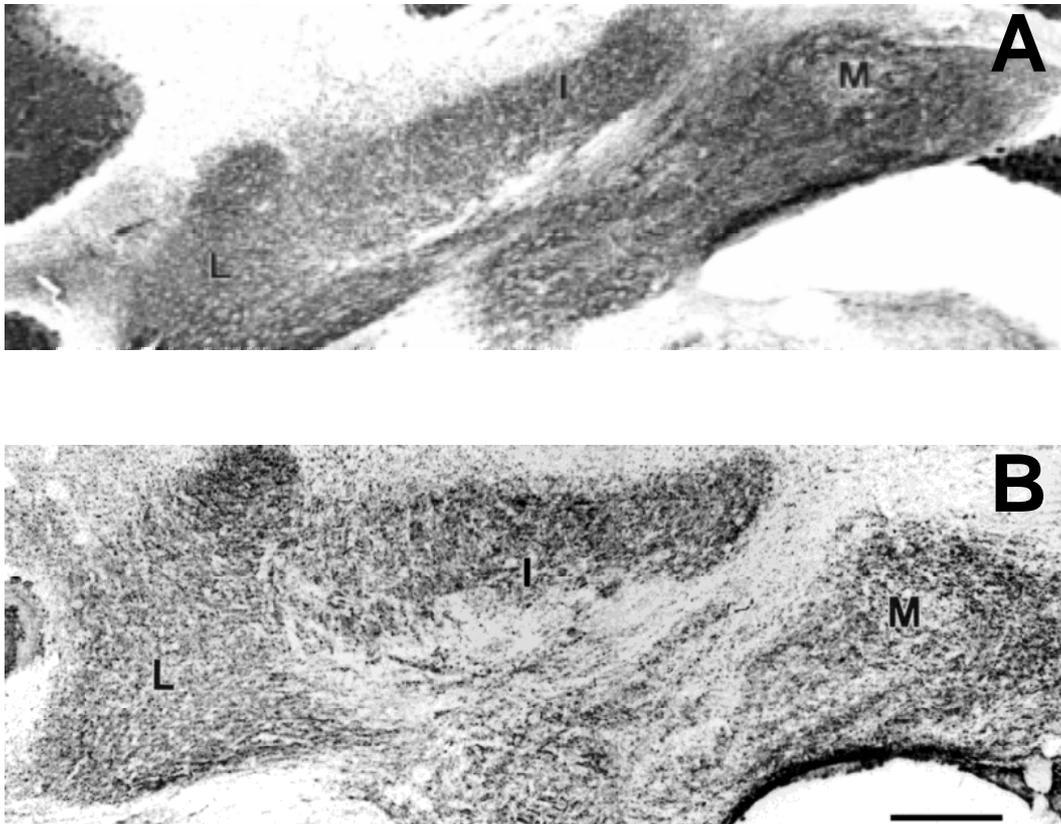


**Abb. 3.1 A-D:** Coronare Schnitte durch das Gehirn eines Wildtypen (A) und der cerebellären Mutanten *sg* (B), *nr* (C) und *Lc* (D) auf Höhe der DCN. Die Präparate wurden mit Antikörpern gegen Calb, die den PC-Verlust dokumentieren, inkubiert. Die Mutanten sind nach dem Ausmaß des PC-Verlustes, der mit dem Verlust an Innervationsdichte in den DCN korreliert, angeordnet: In *sg* (B) ist die Innervationsdichte der DCN wenig reduziert, in *nr* (C) ist nur noch ein Residuum an Innervation in den DCN erkennbar und in *Lc* (D) fehlen Calb-positive Elemente in den DCN komplett.

M = Nucleus cerebellaris medialis; I = Nucleus cerebellaris interpositus; L = Nucleus cerebellaris lateralis.

Der Maßstab entspricht 2 mm.

**Abbildung 3.2 A und B: Wildtyp**



**Abb. 3.2 A und B:** Coronare Schnitte durch die DCN eines Wildtypen, inkubiert mit anti-Calb (A) und anti-Parv (B). Die Innervationsdichte, die in der Immuncytochemie mit anti-Calb (A) gezeigt wird, ist im Wildtyp hoch. In den DCN von Wildtypen sind keine Parv-positiven Somata sichtbar (B).

M = Nucleus cerebellaris medialis; I = Nucleus cerebellaris interpositus; L = Nucleus cerebellaris lateralis.

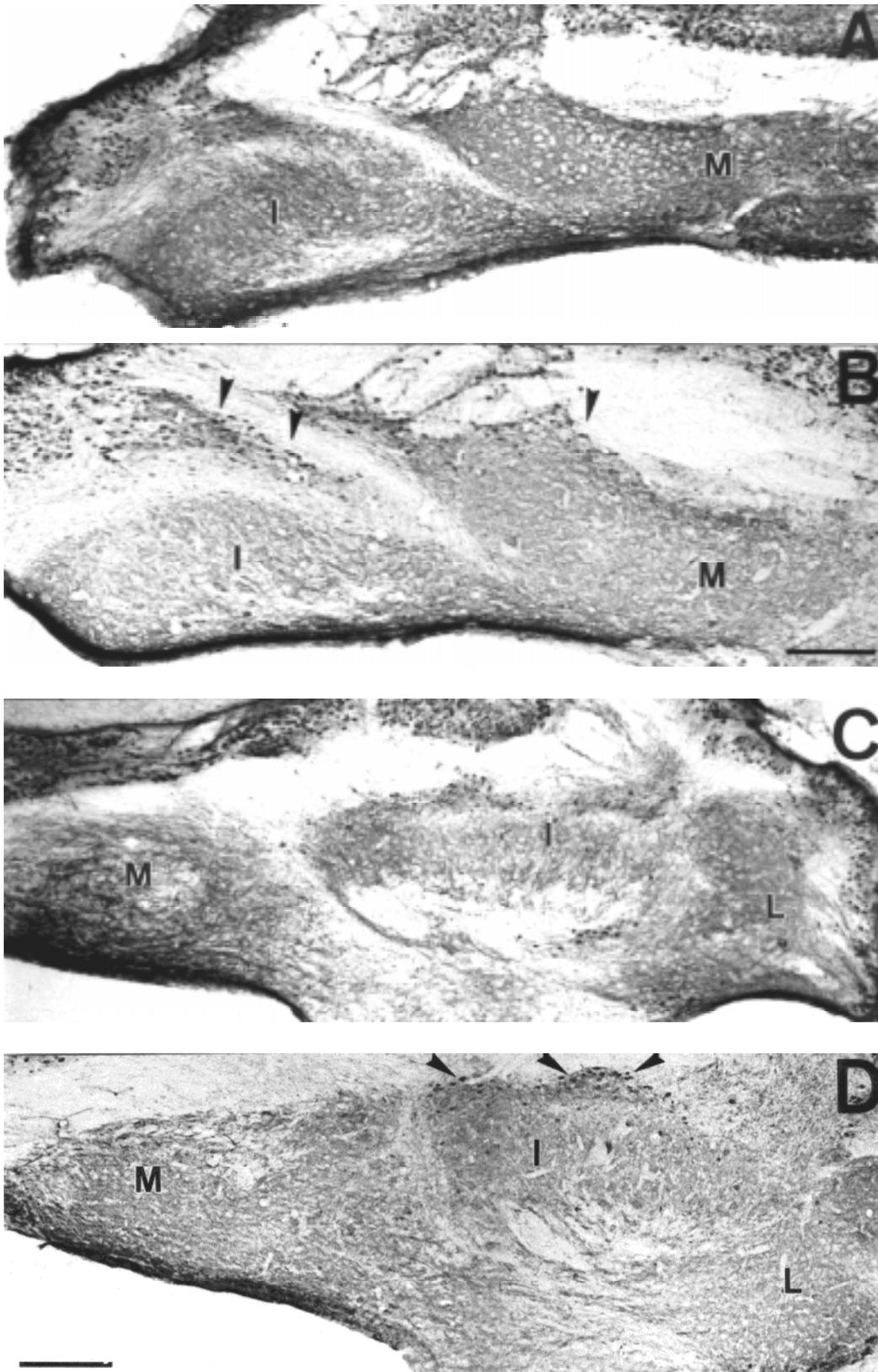
Der Maßstab entspricht 250  $\mu\text{m}$ .

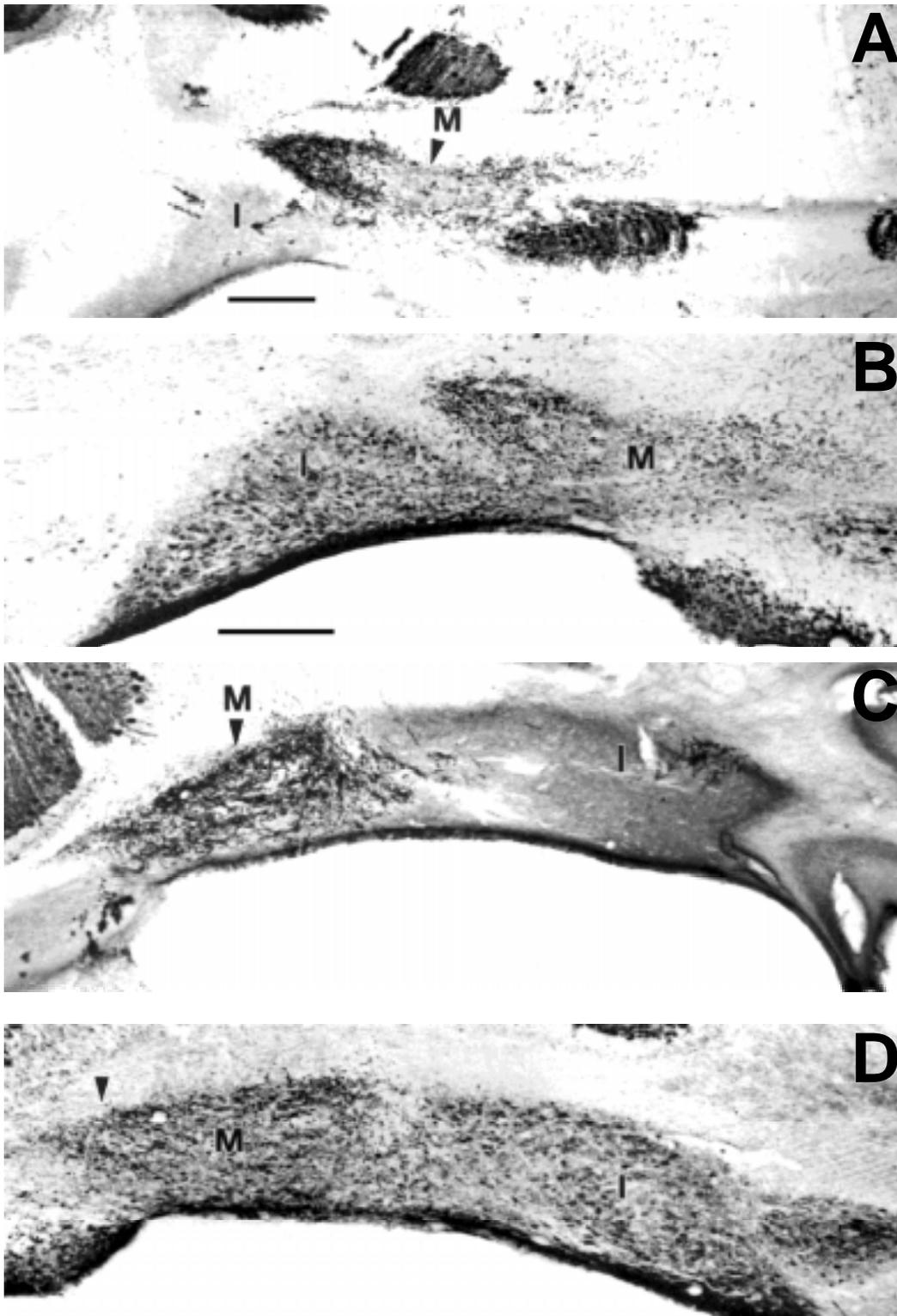
**Abb. 3.3 A-D:** Coronare Schnitte durch die DCN einer *sg*-Mutante in zwei verschiedenen rostrocaudalen Ebenen. A und C sind mit anti-Calb inkubiert, B und D mit anti-Parv. Die Dichte des PC-Inputs in den DCN von *sg*, der durch Immuncytochemie mit anti-Calb demonstriert wird, ist im Vergleich zu Wildtypen deutlich reduziert. Zellen, die sowohl für Calb als auch für Parv immunopositiv sind, werden an den äußeren Grenzen der DCN sichtbar (Pfeile).

M = Nucleus cerebellaris medialis; I = Nucleus cerebellaris interpositus; L = Nucleus cerebellaris lateralis.

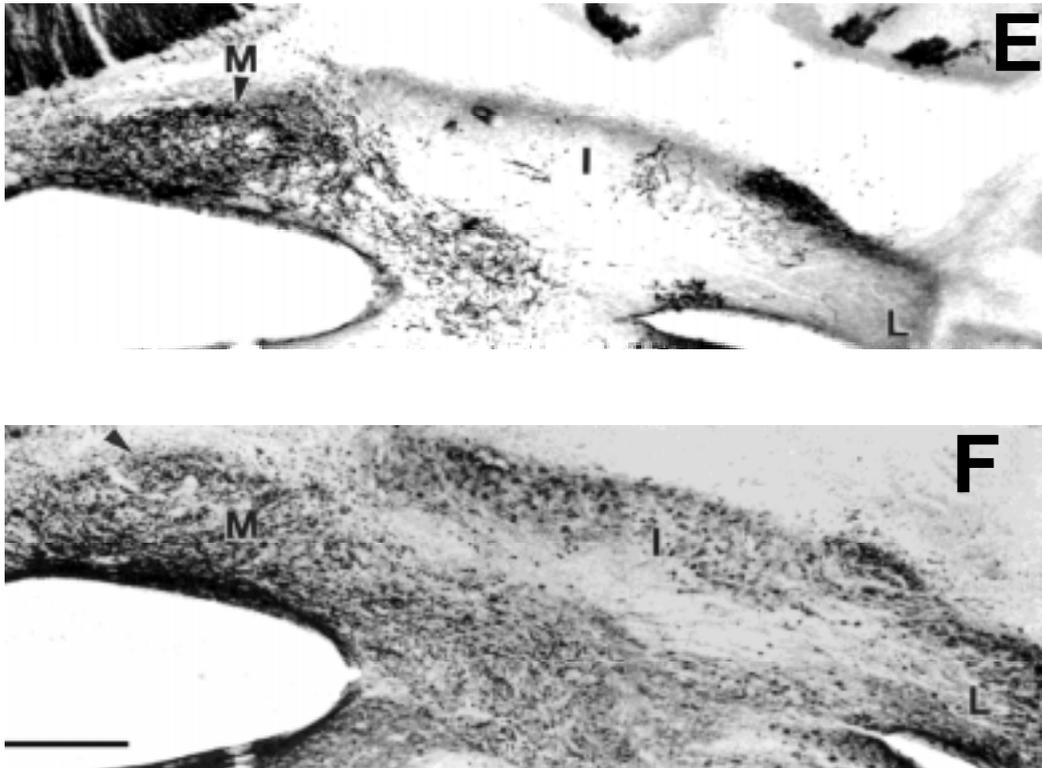
Der Maßstab in B entspricht 200  $\mu\text{m}$  (gilt auch für A), der Maßstab in D entspricht 250  $\mu\text{m}$  (gilt auch für C). Abbildung 3.3 A-D siehe Seite 48.

Abbildung 3.3 A-D: Staggerer- Mutante



**Abbildung 3.4 A-F: Nervous-Mutante**

Legende auf Seite 50



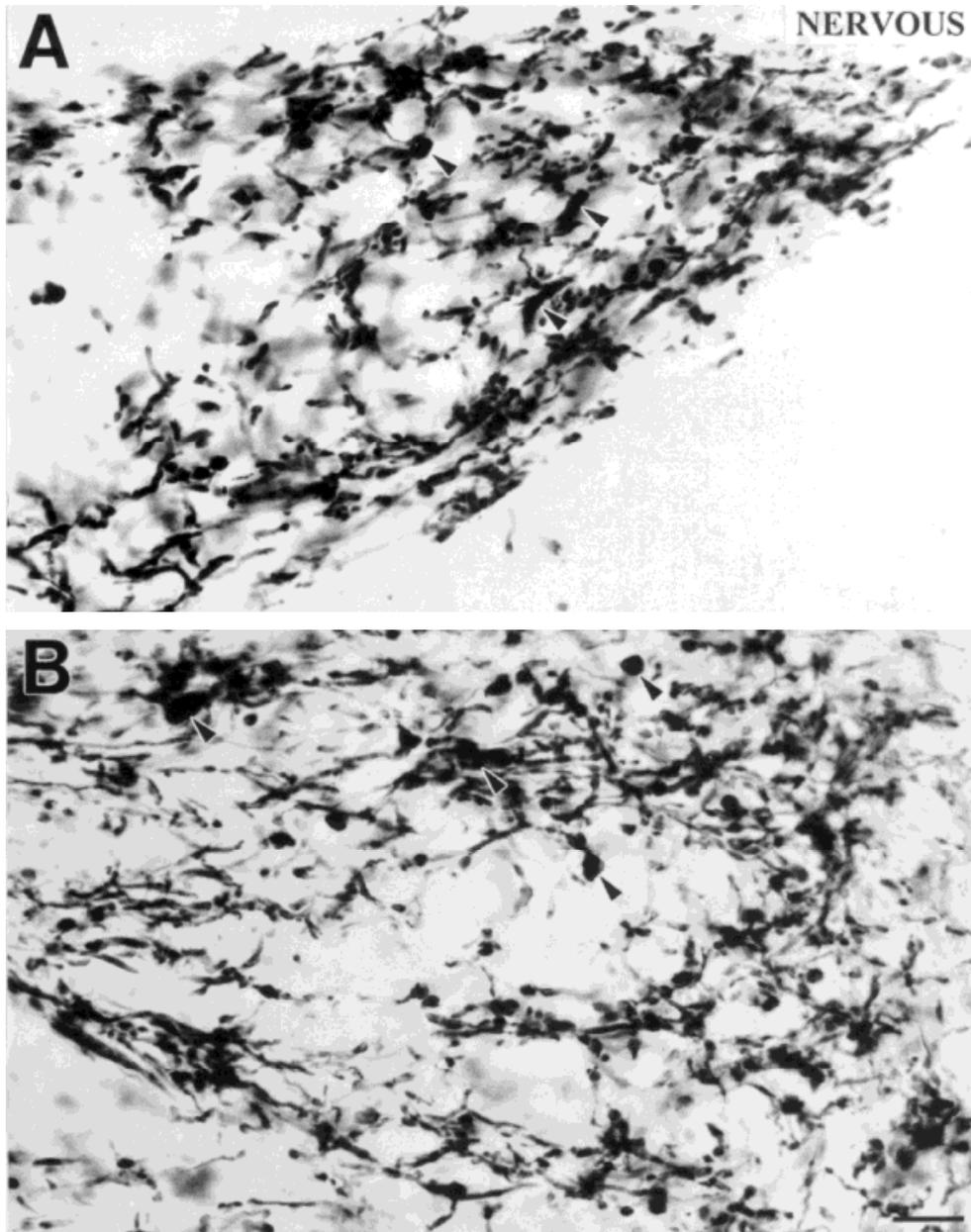
**Abb. 3.4 A-F:** Coronare Schnitte einer *nr*-Mutante in drei verschiedenen rostrocaudalen Ebenen. A, C, E sind mit anti-Calb inkubiert, B, D, F mit anti-Parv. Der PC-Input, der durch die Immunocytochemie mit anti-Calb demonstriert wird, ist im posteromedialen MCN nahezu vollständig eliminiert (A). Dies trifft auch auf den ICN und den LCN zu (A, C, E) mit Ausnahme eines kleinen Areal immunopositiver Fasern und Terminalien dorsal, an der Grenze zwischen ICN und LCN (E). Genau in den Arealen größter Denervation finden sich zahlreiche Parv-positive Neurone (B, D, F). Das einzige Areal, in dem keine Parv-positiven Neurone vorhanden sind, ist die Pars anterior des MCN (D, F, Pfeile).

M = Nucleus cerebellaris medialis; I = Nucleus cerebellaris interpositus;

L = Nucleus cerebellaris lateralis.

Der Maßstab in A entspricht 250  $\mu\text{m}$  (gilt auch für C und E), der Maßstab in B entspricht 250  $\mu\text{m}$  (gilt auch für D), der Maßstab in F entspricht 250  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 3.5 A und B: Nervous-Mutante



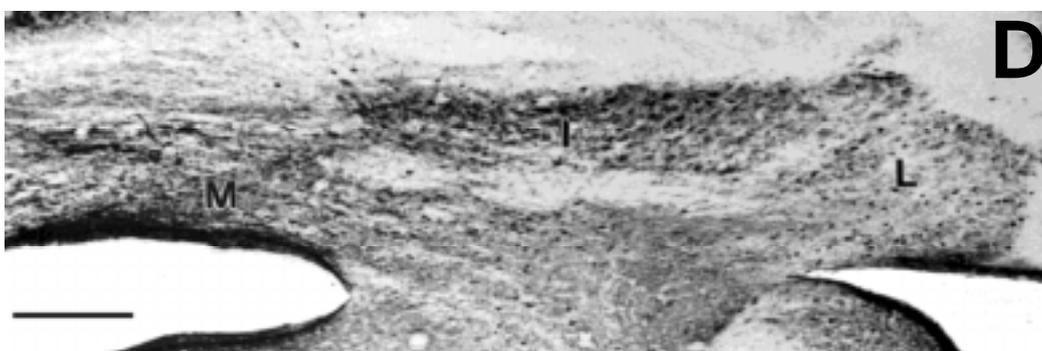
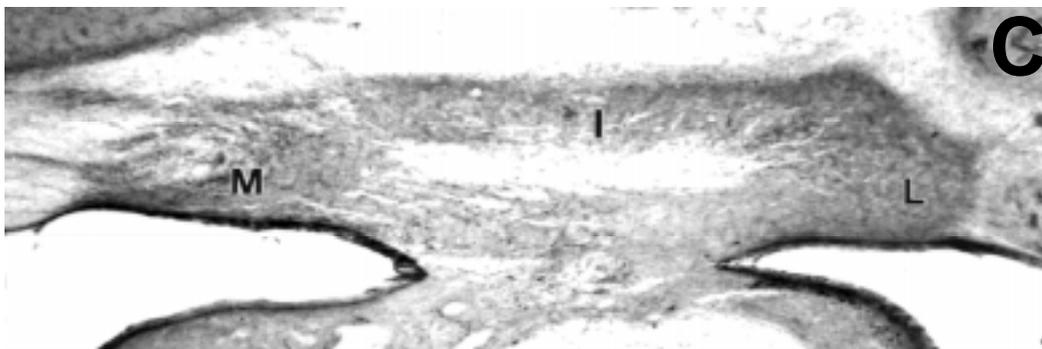
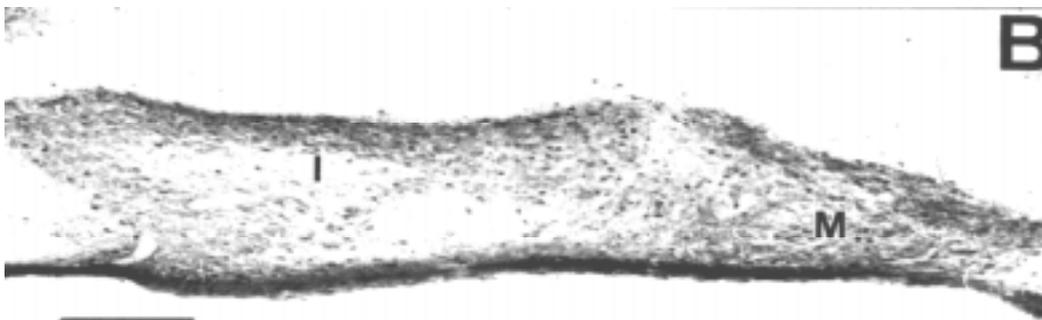
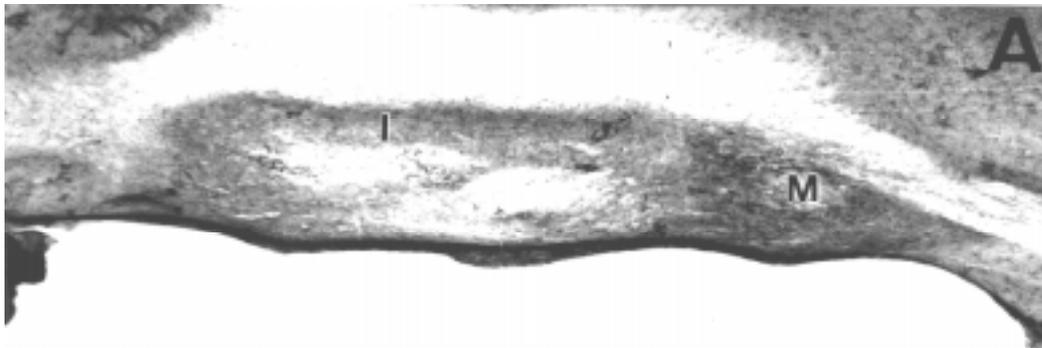
**Abb. 3.5 A und B:** 380-fache Vergrößerung zweier mit anti-Calb inkubierter Schnitte einer *nr*-Mutante.

**A:** Posterolateraler Anteil des MCN, der auch in Abb. 3.4 A zu sehen ist.

**B:** Ausschnitt des MCN, der bereits in Abb. 3.4 C zu sehen ist.

Beide Ausschnitte weisen eine scheinbar dichte Innervation auf. Die genauere Betrachtung zeigt jedoch, dass viele Terminalien im Begriff sind zu degenerieren, was durch ihre Hypertrophie (Pfeile) zum Ausdruck kommt. Der Maßstab entspricht 25  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 3.6 A-D: Lurcher-Mutante



Legende auf Seite 53

**Abb. 3.6 A-D:** Coronare Schnitte einer *Lc*-Mutante in zwei verschiedenen rostrocaudalen Ebenen. A und C sind mit anti-Calb inkubiert, B und D mit anti-Parv. Mit Ausnahme weniger zerstreuter immunpositiver Fasern sind alle drei Untereinheiten der DCN praktisch komplett von PC-Input befreit (A, C). Diese Denervation führt zum Erscheinen zahlreicher Parv-positiver Zellkörper in allen drei Untereinheiten der DCN.  
M = Nucleus cerebellaris medialis; I = Nucleus cerebellaris interpositus; L = Nucleus cerebellaris lateralis.  
Der Maßstab in B entspricht 250 µm (gilt auch für A), der Maßstab in D entspricht 250 µm (gilt auch für C).

### **3.4 Chronologische Korrelation des PC-Verlustes mit dem Erscheinen Parvalbumin-positiver Neurone in den DCN**

#### 3.4.1 Nervous

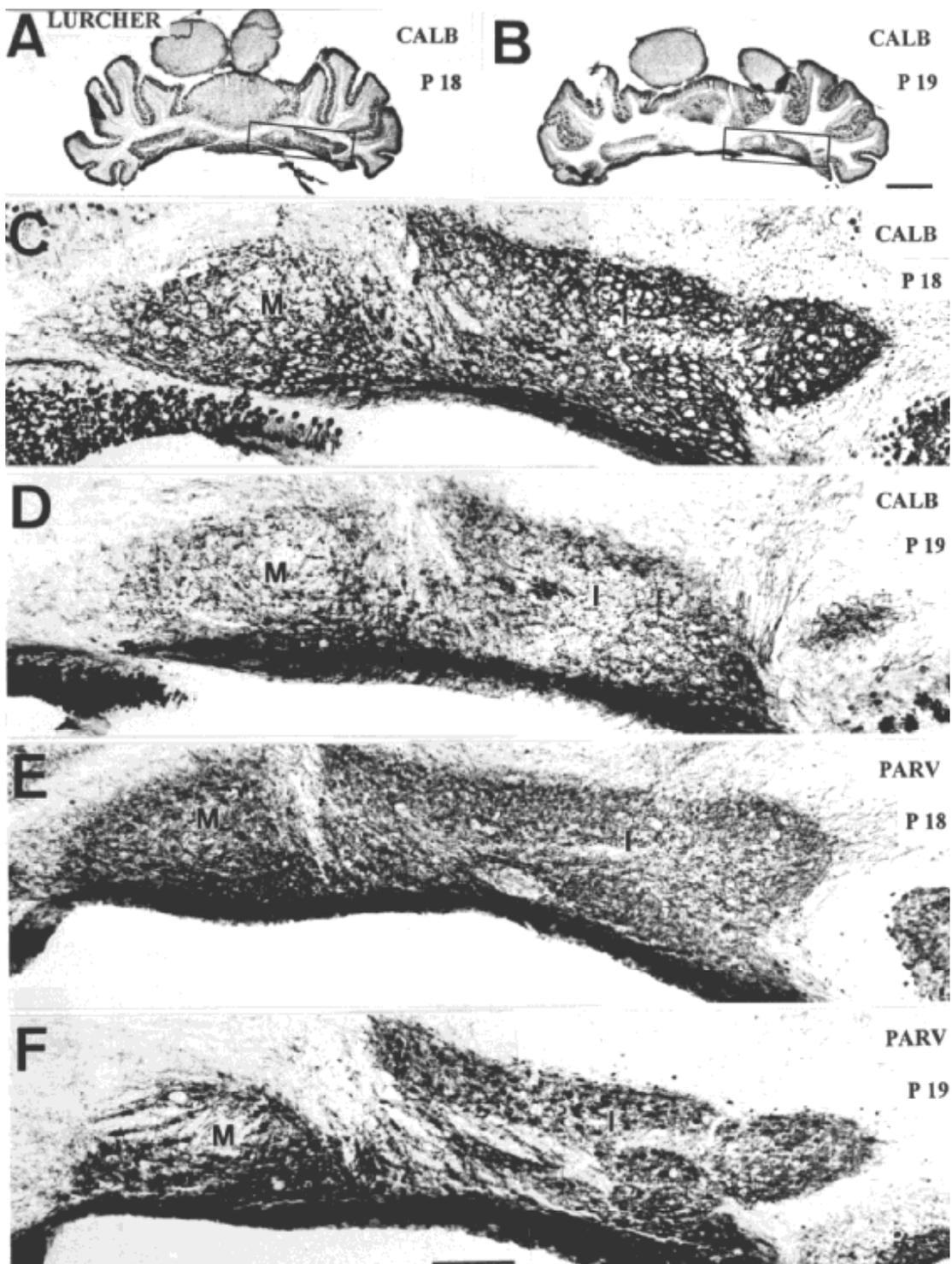
Eine sehr deutlich ausgeprägte Denervation der DCN ist anhand der Calb-Immuncytochemie erstmals an P 23 erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt sind in Analogie zu den Ergebnissen aus adulten Mutanten vor allem ICN und LCN von der Denervation betroffen. Parallel dazu finden sich genau in diesen Arealen mit dem größten Verlust an PC-Input die ersten Parv-positiven Neurone. In den folgenden Tagen schreitet der Denervationsprozeß schnell voran, so dass an P 26 das Verteilungsmuster von Denervation und Lokalisation Parv-positiver Neurone demjenigen der adulten Mutante entspricht (Abb. 3.7 A-F).

#### 3.4.2 Lurcher

In *Lc* findet der Hauptanteil des Innervationsverlustes schon etwas früher statt. Hier läßt sich bereits an P 18 eine deutliche Denervation der DCN feststellen. Parv-positiv Neurone sind zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht zu entdecken. Dies gelingt erst einen Tag später, wenn auch in der Calb-Immuncytochemie der Hauptverlust an Innervationsdichte manifest wird. Verlust von PC-Input und Parv-positiv Neurone sind gleichmäßig über alle Untereinheiten der DCN verteilt (Abb. 3.8 A-F).



**Abb. 3.7 A-F:** Calb (A-D) und Parv Immunocytochemie von *nr* im Alter von 22 und 23 Tagen. A und B gewähren eine Übersicht des cerebellären Cortex und der DCN. Der PC-Verlust ist am 22. Tag gering und am 23. Tag mäßig ausgeprägt. In C und D erlauben Vergrößerungen der DCN aus A und B (siehe Rechtecke) eine Einschätzung des PC-Input Verlustes am 22. und 23. Tag. Während am 22. Tag die DCN noch recht homogen innerviert sind (C), zeigt sich am 23. Tag eine deutliche Reduktion des PC-Inputs im ICN (D). Parv Immunocytochemie (E,F) von alternierenden Schnitten zu C und D zeigen, dass am 22. Tag keine Parv-positiven Neurone vorhanden sind (E), am 23. Tag finden sich im ICN erstmals Parv-positive Neurone. P = Postnataltag. Der Maßstab entspricht 1mm in B (gilt auch für A); 200µm in F (gilt auch für C-F).



**Abb. 3.8 A-F:** Calb (A-D) und Parv Immunocytochemie von *Lc* im Alter von 18 und 19 Tagen. A und B gewähren eine Übersicht des cerebellären Cortex und der DCN. Der PC-Verlust wird am 18. Tag bereits deutlich und ist am 19. Tag sehr ausgeprägt. In C und D erlauben Vergrößerungen der DCN aus A und B (siehe Rechtecke) eine Einschätzung des PC-Input Verlustes am 18. und 19. Tag. Trotz des fortgeschrittenen PC-Verlustes ist die Innervationsdichte am 18. Tag noch hoch (C). Am 19. Tag jedoch ist eine deutliche Reduktion des PC-Inputs in den DCN erkennbar (D). Parv Immunocytochemie (E,F) von alternierenden Schnitten zu C und D zeigen, dass am 18. Tag keine Parv-positiven Neurone vorhanden sind (E), am 19. Tag finden sich Parv-positive Neurone in den DCN (F). P = Postnataltag. Der Maßstab entspricht 1mm in B (gilt auch für A) und 22  $\mu$ m in F (gilt auch für C-F).

### 3.5 Bestimmung der Volumina der DCN

Bereits unter geringer mikroskopischer Vergrößerung fällt auf, dass die Gesamtvolumina der DCN bei den Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen deutlich reduziert sind. Unsere Quantifizierung des mittleren Volumens der DCN von Wildtypen stimmt mit vorangehenden Untersuchungen (Triarhou et al., 1987; Bäurle & Grüsser-Cornehls, 1997; Heckroth, 1994a) überein und beträgt im Mittel  $0,372 \text{ mm}^3$  (SD = 0,018) für eine Hemisphäre.

#### 3.5.1 Nervous

Für die DCN in *nr* ermittelten wir ein mittleres Volumen von  $0,168 \text{ mm}^3$  (SD = 0,016) pro DCN Komplex einer Hemisphäre. Dies entspricht einem Anteil von 45,08% am Volumen von Wildtypen. Die Schrumpfung erscheint dabei in der mediolateralen und dorsoventralen Achse deutlicher ausgeprägt als rostrocaudal. Die Volumenreduktion in *nr* ist im Vergleich zum Wildtypen signifikant ( $p < 0,005$ , Wilcoxon Mann-Whitney-Test).

#### 3.5.2 Lurcher

Die Größe der DCN in *Lc* entspricht in Übereinstimmung mit der Auswertung von Heckroth (1994a) einem mittleren Volumen von  $0,147 \text{ mm}^3$  (SD = 0,031) je Hemisphäre und ist damit im Vergleich zu *nr* weiter reduziert. Der prozentuale Anteil am Volumen von Wildtypen beträgt lediglich 39,55%. Dabei scheint vor allem der dorsoventrale Durchmesser von der Volumenreduktion betroffen zu sein. Die Volumenreduktion in *Lc* ist im Vergleich zum Wildtypen signifikant ( $p < 0,005$ , Wilcoxon Mann-Whitney-Test).

Die Anwendung des Wilcoxon-Tests auf *nr* und *Lc* ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p < 0,02$ , Wilcoxon Mann-Whitney-Test)